

VILNIUS UNIVERSITY

Ingrida Pilypienė

**SIGNIFICANCE OF FOETAL INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME ON
HEALTH AND PSYCHOMOTOR DEVELOPMENT IN PREMATURE INFANTS**

Summary of doctoral dissertation

Biomedical Sciences, Medicine (06B)

Vilnius, 2012

The dissertation was developed in 2007-2011 at Vilnius University.

Academic Consultant

Prof. Dr. Nijolė Drazdienė (Vilnius University, Biomedical sciences,
Medicine – 06B)

The dissertation is defended externally

The dissertation defence is to be held at the Medical Research Council of Vilnius University:

Chairman

Prof. Dr. Habil. Vytautas Usonis (Vilnius University, Biomedical sciences,
Medicine – 06B)

Members:

Prof. Dr. Gražina – Stanislava Drąsutienė (Vilnius University, Biomedical sciences,
Medicine – 06B)

Prof. Dr. Habil. Juozas Kurmanavičius (Zurich University, Biomedical sciences,
Medicine – 06B)

Dr. Jūratė Buinauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical
sciences, Medicine – 06 B)

Dr. Mykolas Mauricas (State Research Institute Center for Innovative Medicine,
Biomedical sciences, Biology – 01B)

The public defence of the dissertation will take place at the open session of the Medical Research Council at 13:00 on May 2, 2012 in the big auditorium of Vilnius University Hospital Santariškių Clinics.

Address: Santariškių Str. 7, LT-08661, Vilnius, Lithuania.

The dissertation summary sent out on 2 April 2012.

The dissertation is available at the library of Vilnius University.

Address: Universiteto Str. 3, LT-01513 Vilnius, Lithuania.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Ingrida Pilypienė

**VAISIAUS UŽDEGIMINIO ATSAKO SINDROMO ĮTAKA NEIŠNEŠIOTO
NAUJAGIMIO SVEIKATAI IR PSICHOMOTORINEI RAIDAI**

Daktaro disertacijos santrauka

Biomedicinos mokslai, Medicina (06B)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2007–2011 metais Vniaus universitete.

Mokslinis konsultantas

prof. dr. Nijolė Drazdienė (Vniaus universitetas, biomedicinos mokslai,
medicina – 06 B)

Disertacija ginama eksternu

Disertacija ginama Vniaus universiteto Medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

prof. habil. dr. Vytautas Usonis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai,
medicina – 06 B)

Nariai:

prof. dr. Gražina – Stanislava Drąsutienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos
mokslai, medicina – 06 B)

prof. habil. dr. Juozas Kurmanavičius (Ciuricho universitetas, biomedicinos mokslai,
medicina – 06 B)

doc. dr. Jūratė Buinauskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos
mokslai, medicina – 06 B)

dr. Mykolas Mauricas (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos
centras, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

Disertacija ginama viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje
2012 m. gegužės 2 d. 13 val. Vaikų ligoninės VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės
Santariškių klinikų filialo didžiojoje auditorijoje.

Adresas: Santariškių g. 7, LT-08408 Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2012 m. balandžio 2 d.
Disertaciją galima peržiūrėti Vniaus universiteto bibliotekoje.
Adresas: Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, Lietuva.

ABBREVIATIONS

CNS	– central nervous system
CRP	– C-reactive protein
ELISA	– enzyme-linked immunosorbent assay
OR	– odds ratio
IL	– interleukin
IVH	– intraventricular haemorrhages
CA	– corrected age
RDS	– respiratory distress syndrome
ROP	– rethinopathy of prematurity
CI	– confidence interval
PVL	– periventricular leukomalacia
RR	– relative risk
SD	– standard deviation
aTNF- α	– tumour necrotic factor-alfa, active
tTNF- α	– tumour necrotic factor-alfa, total
aVEGF	– vascular endothelial growth factor, active
tVEGF	– vascular endothelial growth factor active, total
FIRS	– foetal inflammatory response syndrome

CONTENTS

INTRODUCTION	7
1.1 Background	7
1.2 Aim and objectives of the study	8
1.3 Scientific novelty	9
2. PATIENTS AND METODS	9
2.1 Patients	9
2.2 Estimation of the concentration of umbilical cord blood cytokines IL-6, tTNF- α , tVEGF-A, aTNF- α , and aVEGF-A	11
2.3 Development evaluation in infants at 6 and 12 months' corrected age	11
2.4 Statistical data analysis	12
2.5 Ethical issues and funding of the study	13
3. RESULTS	13
3.1 FIRS and factors of newborns' mothers	13
3.2 Stage I: FIRS and the health of newborns in the early adaptation	16
3.3 Stage II: FIRS and the health of newborns in the later adaptation period	18
3.4 Stage III: FIRS and development in infants at 6 months' corrected age...	21
3.5 Stage IV: FIRS and development in infants at 12 months' corrected age	22
4. CONCLUSIONS	24
5. PUBLICATIONS AND SCIENTIFIC CONFERENCE REPORTS	25
6. SUMMARY IN LITHUANIAN	26
7. BIOGRAPHY	36

INTRODUCTION

1.1 Background

Preterm delivery is the most frequent cause of perinatal mortality and morbidity in the developed countries, including Lithuania. Although the progress of antenatal care is rather significant, the number of preterm deliveries has not decreased in the last decade even in highly developed states. In Lithuania, the rate of preterm deliveries has also remained constant with approximately 5–6 % of all deliveries. Here, 1800 premature infants are born every year.

Improved perinatal care during the last few years has led to higher survival rates for preterm infants. However, with higher survival rates, the number of children demonstrating long-term health disorders that result in a poorer quality of life is increasing. The most common complications in those preterm children include motion disorders, vision and hearing impairment, mental disorders, and chronic lung disease. Thus, to begin the purposive treatment and timely introduce the necessary corrections of the child's development, the early evaluation his/her health and life quality prognosis are relevant when a preterm infant is born.

It is noted that intrauterine infection, often chronic and non-symptomatic in women, is the most frequent reason for a preterm neonate's birth; therefore, the preterm delivery is complicated to predict. Intrauterine infection may cause foetal infection and inflammation thus inducing the inflammatory response in foetus, defined by foetal inflammatory response syndrome (FIRS). FIRS may cause a heavy damage in foetus and newborns as well as later disorders in the infant organism, such as cerebral palsy and chronic lung disease. In scientific resources, FIRS is characterized by the increase in the amount of IL-6 in foetal blood plasma by ≥ 11 pg/ml, but IL-6 and other inflammatory cytokines in the umbilical cord have not been investigated yet in everyday clinical practice.

Resources point out a higher value of immunological studies, as in the event of bacterial invasion, the increase of cytokine concentrations is indicated 6–10 times more often than bacteria themselves are found. The majority data in published researches refers to IL-6 critical values in connection to the CNS injury, but there is only scarce evidence on the evaluation of TNF- α in umbilical cord blood. The VEGF factor, which production is much stimulated in inflammatory response, is on the agenda of recent studies for chronic pulmonary diseases, ROP and brain injury.

In scientific literature data on different forms of TNF- α , VEGF concentrations (active TNF- α , VEGF and total TNF- α , VEGF and protein combinations) could be found; therefore, the interpretation of the results could vary as well.

The foetal inflammatory response syndrome is a problem that has not been examined yet in Lithuania. Researches of cytokines in umbilical cord blood to make prognoses on the health and psychomotor development in a premature infant has not been performed either. Hopefully, the study results will allow a more detail explanation of the reasons for preterm delivery, better understanding of health disorders in premature infants and prognosis of the process of a child development.

1.2 Aim and objectives of the study

The aim of the study is to evaluate the importance of FIRS for the early and later adaptation of premature infants and for psychomotor development at 6 and 12 months' corrected age.

Objectives:

1. To detect and evaluate risk factors related to a pregnant woman, while making prognosis on FIRS.
2. To evaluate the influence of FIRS (when the concentration of IL-6 in umbilical cord blood is ≥ 11 pg/ml) on the health of a preterm newborn after birth and on psychomotor development at 6 and 12 months' corrected age.
3. To identify and evaluate correlation between cytokines IL-6, tTNF- α and aTNF- α , tVEGF and aVEGF in umbilical cord and the health of a preterm newborn in the early and later adaptation and psychomotor development in corrected age of 6 and 12 months.
4. To indicate critical values of cytokines IL-6, tTNF- α and aTNF- α , tVEGF and aVEGF in umbilical cord blood to be used as a marker for predicting the health disorders in the preterm newborns in the early and later adaptation and psychomotor development at 6 and 12 months' corrected age.

1.3 Scientific novelty

Cytokine studies designed to investigate causes of the preterm delivery and morbidity of the preterm neonate has been in focus of scientific researches in the last decade. There have been studies published indicating the correlation between FIRS and the CNS injury in a preterm neonate and chronic lung disease. Speaking about researches proving relation of the perinatal inflammatory response and psychomotor development in a preterm newborn, these are few. Since the correlation between FIRS and retinopathy of prematurity has been discovered only recently, investigations in this field are also scarce. Attempts to identify how the concentrations of VEGF in umbilical cord blood interrelate with retinopathy of prematurity have not been made. Publications on correlations between foetal inflammatory markers TNF- α and VEGF and psychomotor development in a preterm newborn are also not numerous; therefore, such studies has not been applied in everyday practice as routine ones, and they require further investigations with data accumulated in databases.

Threatening FIRS complications suggest the presumption that the early evaluation of the health of a preterm infant and his/her life quality prognosis are highly relevant to start purposive treatment and the child development correction in early stages. For this purpose, studies of cytokines in umbilical cord blood that have not been yet made in Lithuania for predicting the infant's health would be helpful. The present paper is the first clinical research targeted to the evaluation of the significance of inflammatory cytokine changes for the state of a preterm newborn after the birth and his/her further psychomotor development.

2. PATIENTS AND METODS

2.1 Patients

The case - control study was performed in Vilnius City Clinical Hospital and Children's Hospital, Affiliate of Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos, Centre of Neonatology in 2007-2010. The study involved preterm infants, born at 22-34 weeks of gestation in Vilnius City Clinical Hospital, and their mothers. Their eligibility criteria were the following: 1) the age of a parturient woman >18 m; 2) 22-34 weeks and 6 days of gestation; 3) properly attached placenta;

4) no diabetes, chronic cardiovascular and respiratory system diseases, severe anaemia (Hb <80 g/l) and autoimmune and oncological diseases in a parturient woman. The exclusion criterion: 1) a stillbirth; 2) alcoholism and drug addiction of a parturient woman; 3) malformations in newborn; 4) haemolytic newborn disease; 5) umbilical cord artery blood pH <7.00; 6) birth trauma in the newborn; 7) mother's refusal to participate in the study.

Immunological studies of cord blood cytokines were performed at the State Research Institute at the Center for Innovative Medicine. Psychomotor development of infants at 6 and 12 months' corrected age (CA) was evaluated in the Centre of Neonatology of Children's Hospital, Affiliate of Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos.

The examination of newborns (later infants) consisted of four stages: Stage I – at the first week after birth; Stage II – at leaving the hospital – post conceptual age 36-37 weeks; Stage III - 6 months' CA; Stage IV - 12 months' CA.

All newborns were investigated according to the same scheme:

- 1) the data obtained from clinical, laboratory and instrumental tests of newborns performed in the early and later adaptation were examined;
- 2) tests of umbilical cord blood cytokines in each newborn were evaluated. Depending on the concentration of umbilical cord blood cytokines IL-6, the participants were assigned to FIRS (IL-6 \geq 11 pg/ml) or control (IL-6<11 pg/ml) group; clinical, instrumental and laboratory test results after the birth of newborns in both groups were compared, as well as newborn development at 6 and 12 months' CA;
- 3) the correlation of umbilical cord blood cytokines IL-6, aTNF- α , tTNF- α , aVEGF-A, tVEGF-A and values of the newborn's health was indicated;
- 4) influence of FIRS on the health and psychomotor development of the newborn up to 12 months' CA was determined;

Additionally, social, economic, anamnesis, and obstetric factors in the newborns' mothers were analysed.

2.2 Estimation of the concentration of umbilical cord blood cytokines

IL-6, tTNF- α , tVEGF-A, aTNF- α , and aVEGF-A

After the birth of the infant, the umbilical blood cord vein was punctuated. 5 ml of blood was taken to a vacuum tube. Within an hour, the blood sample taken was centrifuged for 14 min at 1500 rpm/min no later than within 1 hour in the laboratory of the Hospital. Blood plasma was placed into 1.5 ml micro tubes and stored at -80 °C till the quantitative cytokine studies.

To quantify the amount of plasma cytokines in umbilical blood cord, the commercial ELISA kits of IL-6, TNF- α , VEGF-A (Human IL-6, TNF- α total, VEGF-A total, Bender MedSystems, Austria) were used. Active TNF- α and VEGF-A were detected with the help of commercial BioLISA kits (Human TNF- α , VEGF-A BioLISA, Bender MedSystems, Austria). All studies were performed according to the manufacturer's instructions. The amount of cytokines was calculated according to standard curves by a special programme for ELISA result evaluation Gen5 Microplate Data Collection & Analysis Software (BioTek Instruments, USA).

2.3 Development evaluation in infants at 6 and 12 months' CA

Anthropometric measurements. Body mass of newborns, their height and head size were measured following usual requirements. Where the birth weight of a newborn was lower than 1500 g, we followed growth curves suggested by US scientists, and where this was ≥ 1500 g, newborn growth curves approved in Lithuania were used.

Evaluation of psychomotor development in infants according to methods of Munich functional development diagnostics. The infants were examined in their alert state 1-2 hours after the last nursing, in the calm and well-lit room at 19-24°C. The examination included standard test tools. The development of crawling, sitting, toddling, grasping, perception, talking, and social fields in infants at 6 months' CA, as well as speech perception in infants at 12 months' CA, was also evaluated. The age of each functional field of the development was estimated. The infant development curves were included in the study survey. Infant developmental disorder was attributed to 1 of 4 disorder group based on the correlation of functional fields of development: 1)

motion (motor) developmental disorder; 2) fine motor developmental disorder; 3) psychosocial developmental disorder; 4) mixed infant developmental disorder.

2.4 Statistical data analysis

Based on *Cochrane* database formula, sample volume in this research was estimated as follows:

$$n = \frac{z^2 v(1-v)}{\Delta^2}$$

Before the study, it was determined that the occurrence of chorioamnionitis together with funisitis – histological expression of FIRS – among preterm deliveries in Vilnius City Clinical Hospital was around 10 %; thus, it was estimated that the sample volume of n=138 ensures population with the standard deviation of ±5 % at the confidence interval of 95%. 158 newborns were included.

Statistical data analysis was performed using a SPSS 15.0 version of a standard statistical programme and 6.0 version of *Statistica*. The *Kolmogorov-Smirnov* test was used to for verification of hypotheses on normality of parameter distribution. Quantitative variables of two independent groups were compared applying the parametric *Student's t-test* and non-parametric *Mann-Whitney* test; more than two groups were compared by the dispersion analysis method ANOVA. Chi-squared criterion (χ^2) was employed to evaluate interdependence of qualitative characteristics. Considering variable distribution, there was the *Pearson* or *Spearman* correlation coefficient. Data considered statistically significant, when $p < 0.05$. The specificity and sensitivity of testing were assessed analysing receiver operator characteristic curves (ROC). Factors that enable predicting the occurrence of FIRS were identified by the *backward stepwise method of* multifactorial logistic regression analysis. Having evaluated the influence of the infant gestation age, the relative risk (RR) of health and psychomotor development disorders in newborns was indicated based on the model of *Cox* regression analysis.

2.5 Ethical issues and funding of the study

The study was performed with the permission No. 14 approved by the Lithuanian Bioethics Committee as of 20 June 2007. Immunological studies of cord blood samples were funded by the Lithuanian State Science and Studies Foundation (2008-04-07 Nr. T-101/08).

3. RESULTS

3.1 FIRS and factors of newborns' mothers

Considering the studied groups, statistically significant variations in social and demographic factors of newborns' mothers were not observed (Table 1).

Table 1. Social and demographic factors of newborns' mothers

Factors		Total n=158	FIRS gr. n=52	Control gr. n=106	p value
Age, A±SD, years		28.9± 5.9	27.3± 6.5	28.3± 5.2	0.7
Husband's age, A±SD, years		30.6± 6.2	29.8± 5.6	31.2± 6.4	0.2
Body Mass Index, A± SD, kg/m ²		22.1±4.1	22.4± 4.5	22.0±3.9	0.6
Living conditions, A±SD, points		8.8±1.3	8.6±1.1	8.8±1.4	0.4
Living place, %	Urban	84.2	80.8	85.8	0.4
	Rural	15.8	19.2	14.2	
Education, %	Incomplete secondary	11.4	13.5	10.4	0.007
	Secondary or further	36.7	53.8	28.3	
	Incomplete higher	10.1	7.7	11.3	
	Higher	41.8	25.0	50.0	
Pregnancy, %	First	38.6	28.8	43.4	0.09
	Second and >	61.4	71.2	56.6	
Initial consultation, A±SD, week		9.8±6.0	10.8±6.8	9.3±5.5	0.2

A±SD – average±standard deviation

Diseases newborns' mothers have had, body temperature changes, and blood pressure variations during pregnancy does not differ in the compared groups ($p > 0.05$). Analysing data of the perinatal period, it can be stated that pregnancy of mothers in the FIRS group was shorter; the waterless period was longer; they more often had natural labour and delivery and were more frequently diagnosed with postpartum endometritis (Table 2).

Table 2. Comparative analysis of the perinatal period of newborn mothers

Data of newborns' mothers		Total n=158	FIRS gr. n=52	Control gr. n=106	p value/ χ^2 =; df; p value
Gestation weeks, %:	24-26	11.4	21.2	6.6	0.01
	27-28	8.2	17.3	3.8	0.004
	29-30	8.2	15.4	4.7	0.02
	31-32	27.2	28.8	26.4	0.8
	33-34	44.9	17.3	58.5	<0.001
Preterm breaking of waters, %	Yes	60.8	61.5	60.4	0.9
	No	39.2	38.5	39.6	
Quantity of amniotic fluids, %	Large	1.9	1.9	1.9	$\chi^2=2.6$; l.l. =3. p=0.5
	Average	92.3	96.2	94.9	
	Small	3.8	1.9	2.5	
	Almost none	1.9	0	0.7	
Waterless period. hours, %	<18	74.1	61.5	80.2	0.01
	18 and >	25.9	38.5	19.8	
Tocolysis, %	Yes	67.1	67.3	67.0	1.0
	No	32.9	32.7	33.0	
Steroids to encourage foetal lung development, %	Full course	56.3	63.5	52.8	$\chi^2=1.6$; l.l. =2, p=0.4
	Incomplete course	19.0	15.4	20.8	
	None	24.7	21.1	26.4	
Cervical cultures, %	Positive	17.1	13.5	18.7	$\chi^2=1.5$; l.l. =2. p=0.7
	Negative	25.3	25.0	25.5	
	Not taken	57.6	61.5	58.5	
Way to give birth, %	Naturally	63.7	78.8	56.2	0.005
	Caesarean section	36.3	21.2	43.8	
Postpartum endometritis	Yes	13.9	26.9	7.5	0.001
	No	86.1	73.1	92.5	

While examining blood samples of newborns' mothers during the perinatal period, a significant correlation between the amounts of blood leukocytes, CRP concentrations and FIRS ($p<0.05$) was detected. The analysis of other values of newborns' mothers during the perinatal period – amounts of erythrocytes and platelets – helped to find insignificant difference of these values in the compared groups ($p>0.05$).

In the histological placenta study, the inflammatory changes in placenta were detected in 40.3% of cases studied. The frequency of histological chorioamnionitis without funisitis and deciduitis did not differ in both groups ($p>0.05$). Histological chorioamnionitis with funisitis was found in 51 % of placentas in the FIRS group, while the control group demonstrated such changes in 1 % of placentas only ($p<0.001$). No pathological changes were detected in 10 % of placentas in the FIRS group.

Risk factors of the pregnant woman resulting in FIRS occurrences were detected (Tab 3).

Table 3. Odds ratios of single-factor logistic regression of the risk factors of the pregnant woman in predicting FIRS

Risk factor		Probability of having FIRS in a newborn (c. blood IL-6>=11 pg/ml) OR [95 % CI]
Education	Higher	1
	Other	3.0 [0.92-6.46]
Previous deliveries, times	<2	1
	2 and >	2.5 [1.3-5.0]
Gestation weeks	>30	1
	30 and <	6.6 [3.1-14.1]
Sexual activity during pregnancy, times/week	<3	1
	3 and >	2.2 [1.1-4.3]
Waterless period, hours	<18	1
	18 and >	2.5 [1.2-5.3]
Temperature before delivery, °C	<37	1
	37 and >	6.1 [2.0-18.3]
Natural labour and delivery	No	1
	Yes	3.0 [1.4-6.4]
Placenta examination	Norm/non-inflammatory changes	1
	Histological chorioamnionitis (w/wo funisitis)/deciduitis	9.4 [4.3-20.3]
Cord artery blood pH	>7.2	1
	<7.2	4.5 [1.1-18.8]
Postpartum endometritis	No	1
	Yes	4.5 [1.8-11.6]

OR – odds ratio; CI – confidence interval

The backward stepwise method of binary logistic multi-factor regression was used to identify opportunity ratios of individual factors and selected their optimal combination for accurate FIRS (Table 4).

Table 4. Odds ratios of multi-factor logistic regression of the risk factors of the pregnant woman in predicting FIRS

Risk factor		Probability of having FIRS in a newborn (c. blood IL-6>=11 pg/ml) OR [95 % CI]
Gestation weeks	>30	1
	30 and <	4.4 [1.7-11.4]
Mother's temperature before delivery, °C	<37	1
	37 and >	6.7 [1.4-31.2]
Placenta examination	Norm/non-inflammatory changes	1
	Histological chorioamnionitis (w/wo funisitis)/deciduitis	8.4 [3.4-20.7]
Postpartum endometritis	No	1
	Yes	4.9 [1.4-16.8]
Constant=-2.65; p<0,001		

OR – odds ratio; CI – confidence interval

3.2 Stage I: FIRS and the health of newborns in the early adaptation

The sex of newborns is distributed almost equally between girls and boys; no difference between groups was detected ($p>0.05$). The average period of gestation was 31.3 ± 2.9 week, and it was significantly ($p<0.001$) shorter in the FIRS group - 29.5 ± 3.1 week if compared with the control group - 32.2 ± 2.4 week. The birth weight of the FIRS group newborns was 1424.7 ± 564.0 g, while this in the control group was 2006.3 ± 554.1 g ($p<0.001$). More hypotrophic newborns were born in the FIRS group ($p<0.05$). The average umbilical cord artery blood pH in newborns was 7.3 ± 0.1 , no difference between groups was observed ($p>0.05$); however, umbilical cord artery blood pH ≤ 7.20 was more frequently found in the FIRS group ($p=0.026$).

It was indicated that points of the FIRS group newborns according to the Apgar scoring system were significantly ($p<0.001$) lower than in the control group, and they positively and significantly correlated with the gestation age and birth weight ($r=0.7$; $p<0.001$). In the FIRS group, the pharmacological correction of hemodynamics was more often applied ($p<0.05$). The duration of jaundice in newborns did not differ between the groups ($p>0.05$).

Respiratory distress syndrome (RDS) was diagnosed in 78% of newborns, in 50% of cases it was of a medium or severe form. The severe form of RDS was more frequently observed in newborns of the FIRS group ($p=0.002$). The correlation between the incidence of RDS and the amounts of IL-6 and tTNF- α in cord blood was revealed. Having evaluated the gestation age of newborns and based on the *Cox* regression analysis, the relative risk of the severe RDS was detected where the concentration of cord blood IL-6 was ≥ 11 pg/ml and over the critical values of IL-6 and tTNF- α set out during the study (Table 5).

Table 5. Regression analysis model, predicting RDS of a severe degree

FIRS (cord blood IL-6\geq11 pg/ml)		Severe RDS RR [95 % CI]
No		1
Yes		4.0 [1.9-8.5]
p<0.001		
Critical value of cord blood cytokine		Severe RDS RR [95 % CI]
IL-6>15 pg/ml	No	1
	Yes	5.2 [2.5-10.8]*
tTNF- α >105.4 pg/ml	No	1
	Yes	8.4 [4.0-17.7]*

RDS – Respiratory Distress Syndrome; RR – Relative Risk; *p<0.001

Neurosonoscopy revealed no pathological changes in the brain in 66.9% of newborns tested; 18.5 % of newborns were diagnosed with I° IVH, 9.6 % - II° IVH, and to 5.1 % of babies \geq III° IVH ($\chi^2=28.8$; 1.l.=3; p<0.001) was found. In the FIRS group, there were much more newborns with II° and \geq III° IVH (p<0.01) detected during neurosonoscopy. Such changes had a significant relation to both the umbilical cord blood IL-6 and tTNF- α concentration. The critical values of the umbilical cord blood cytokines IL-6 and tTNF- α in predicting \geq III° IVH (Table 6) were established. The relative risk in predicting \geq III° IVH (Table 6) was estimated taking into consideration the influence of the gestation age on the brain of the preterm infant.

Table 6. Regression analysis model, predicting \geq III° IVH for a newborn in the early adaptation

FIRS (cord blood IL-6\geq11 pg/ml)		\geqIII° IVH RR [95 % CI]
No		1
Yes		8.0 [1.6-40.2]
p<0.05		
Critical value of cord blood cytokine		\geqIII° IVH RR [95 % CI]
IL-6 >13 pg/ml	Ne	1
	Taip	10.0 [2.0-50.1]*
tTNF- α >116.4 pg/ml	Ne	1
	Taip	44.2 [5.4-362.9]**

IVH – intraventricular haemorrhages; RR – Relative Risk; *p<0.01; ** p<0.001

No correlation was detected among concentrations of the cord blood cytokines α TNF- α , aVEGF, tVEGF, severe RDS and neurosonoscopic changes in the early adaptation period. The risk factors of newborns' blood values predicting FIRS were indicated (Table 7).

Table 7. Odds ratios of multi-factor logistic regression of the newborns' blood values in the early adaptation period, predicting FIRS

Blood value		FIRS (c. blood IL-6 \geq 11 pg/ml) OR [95 % CI]
Haemoglobin, g/l	>182	1
	\leq 182	2,8 [1,2-6,2]
Erythroblasts /100	<3	1
	\geq 3	2,2 [1,0-4,8]
CRP, mg/l	<4,5	1
	\geq 4,5	5,5 [2,3-13,0]
Constant =-1.985; p<0,001		

139 newborns had the bacteriologic blood test performed. The positive blood cultures were found in one newborn from the FIRS group and one from the control group (p=1.0). *Listeria monocytogenes* was cultured in the blood sample of the newborn from the FIRS group, and *Klebsiella pneumoniae* – in the blood sample of the one from the control group.

3.3 Stage II: FIRS and the health of newborns in the later adaptation period

The study revealed no classification change in neurosonoscopic CNS changes of the early and later adaptation period (the Wilcoxon test, z=0.6; p=0.5). The neurosonoscopic changes were not found in 59.9 % of the newborns tested, while in 32.9 % of the newborns insignificant (I° IVH, insignificantly dilated brain ventricles and etc.), and in 7.2 % marked, changes in brain (PVL, hydrocephaly, ventriculomegaly; $\chi^2=21.7$; df=3; p<0.001) were diagnosed. Neurosonoscopic changes more often observed the newborns of the FIRS group, and PVL was diagnosed in 2 newborns, i.e. 1.3 % of all the newborns tested. The two babies belonged to the FIRS group.

A significant correlation between the amount of IL-6 in umbilical cord blood and CNS pathology was detected. In the group of pathological CNS changes irrespective of the degree of

injury (marked, insignificant changes, PVL), the concentration of IL-6 was found to be significantly different in comparison with the babies without the registered changes. The amounts of the umbilical cord blood tTNF- α were subject to association with neurosonoscopic changes in babies in this period of their life (p=0.067). Taking into account the gestation age and by means of the regression analysis, the relative risk of serious CNS injury was indicated if the cord blood IL was >11 pg/ml and the critical value of the cord blood IL-6 found during the study was >13 pg/ml (Table 8). The critical value of the umbilical cord blood IL-6 in predicting PVL was insignificant (p >0.05).

Table 8. Regression analysis model, predicting marked neurosonoscopic changes in the newborn in the later adaptation period

FIRS (cord blood IL-6 \geq 11 pg/ml)		Marked neurosonoscopic changes RR [95 % CI]
No		1
Yes		8.3 [2.2-31.7]
p<0.01		
Critical value of cord blood cytokine		Marked neurosonoscopic changes RR [95 % CI]
IL-6 >13 pg/ml	Ne	1
	Taip	9.9 [2.6-37.9]

Marked neurosonoscopic changes: PVL, hydrocephaly, ventriculomegaly; RR – Relative Risk; p=0.001

Retinopathy of prematurity (ROP) was diagnosed in 24.8 % infants who survived till the end of the later adaptation period (n=149). It was detected that in 57 % of the newborns diagnosed with ROP, its stage was mild/severe (II-III st., or III-IV st.). ROP was more often found in the FIRS group ($\chi^2=8.9$; l.l.=3; p=0.031).

The correlation between ROP and the amounts IL-6 or tTNF- α in umbilical cord blood was determined. The study shows that cytokine tTNF- α in umbilical cord blood also predicts the ROP development. The critical values of cytokines IL-6 and tTNF- α and II-III/ III-IV st. of ROP prognosis are given in Table 9.

Table 9. Regression analysis model predicting II-III/ III-IV st. of ROP

FIRS (cord blood IL-6≥11 pg/ml)	RR of II-III/ III-IV st. of ROP [95 % CI]
No	1
Yes	2.5 [1.1-6.0]

p<0.05

Concentration of cord blood cytokine	RR of II-III/ III-IV st. of ROP [95 % CI]	RR of ROP development to III-IV st. [95 % CI]	
IL-6 >13 pg/ml	No Yes	1 3.0 [1.3-7.1]*	-
tTNF-α >114.6 pg/ml	No Yes	1 7.0 [2.9-16.6]**	1 3.1 [1.2-8.1]*

*p<0.05; **p<0.001

ROP – Retinopathy of prematurity; RR – Relative Risk;

The amount of aVEGF in in umbilical cord blood tended to correlate with ROP (p=0.064).

Necrotizing enterocolitis and open arterial duct were more often diagnosed in newborns of the FIRS group; however, the difference between the groups was not significant enough (p=0.062 and p=0.139). None of the newborns was diagnosed with bronchopulmonary dysplasia.

During the period of investigation before Stage II, 9 infants - 5.7 % of all the tested – died. They belonged to the FIRS group. The mortality rate in this group was 17.3 %. The difference between the compared groups was significant (p<0.001) but the death prognosis when IL-6≥11 pg/ml in umbilical cord blood was not (p>0.05). The study shows that the death syndrome of newborns correlated with the amounts of both IL-6 and tTNF-α in umbilical cord blood.

Regression analysis model, predicting death for the newborn, is given in Table 10.

Table 10. Regression analysis model, predicting death for the newborn

Concentration of cord blood cytokine	RR of the newborn's death [95 % PI]	
IL-6 >12.7 pg/ml	Ne Taip	1 22.8 [2.8-188.4]*
tTNF-α>365 pg/ml	Ne Taip	1 58.2 [10.7-316.9]**

RR – Relative Risk; *p<0.01; **p<0.001

The correlation between other tested cytokines aTNF- α, aVEGF-A, tVEGF-A and retinopathy of preterm infants, neurosonoscopic changes and lethal outcome was not determined.

3.4 Stage III: FIRS and development in infants at 6 months' corrected age

Anthropometric measurements in the infants at 6 months' CA in both compared groups did not differ ($p>0.05$). The comparative average age analysis of functional fields of psychomotor development is given in Table 11.

Table 11. Development of infants at 6 months' CA

Functional field/age	Total n=131	FIRS group n= 37	Control group n=94	p value
Crawling age, months				
Average \pm SD	5.67 \pm 0.66	5.43 \pm 0.80	5.77 \pm 0.58	0.005
Median	6	6	6	
[min - max]	[3-6]	[3-6]	[3-6]	
Sitting age, months				
Average \pm SD	5.79 \pm 0.51	5.59 \pm 0.72	5.87 \pm 0.37	0.020
Median	6	6	6	
[min - max]	[4-6]	[4-6]	[4-6]	
Toddling age, months				
Average \pm SD	5.69 \pm 0.58	5.54 \pm 0.73	5.76 \pm 0.50	>0.05
Median	6	6	6	
[min - max]	[3-6]	[3-6]	[4-6]	
Grasping age, months				
Average \pm SD	5.83 \pm 0.48	5.65 \pm 0.68	5.90 \pm 0.36	0.003
Median	6	6	6	
[min - max]	[3-6]	[3-6]	[4-6]	
Perception age, months				
Average \pm SD	5.82 \pm 0.47	5.65 \pm 0.63	5.89 \pm 0.37	0.006
Median	6	6	6	
[min - max]	[4-6]	[4-6]	[4-6]	
Talking age. months				
Average \pm SD	5.37 \pm 0.76	5.24 \pm 0.80	5.43 \pm 0.74	>0.05
Median	6	5	6	
[min - max]	[3-6]	[4-6]	[3-6]	
Social age, months				
Average \pm SD	5.76 \pm 0.57	5.57 \pm 0.69	5.83 \pm 0.50	0.009
Median	6	6	6	
[min - max]	[3-6]	[4-6]	[3-6]	

The data given in Table 11 show a poorer development of motor functions in the infants of the FIRS group; moreover, social retardation was also observed in this group. The correlation between the amounts of aVEGF in umbilical cord blood and the head size in the infant at 6 months' CA, as well as the amounts cytokines IL-6 and tTNF- α in umbilical cord blood and psychomotor development in the infants was determined; however, the critical values were not significant for the

development prognosis ($p>0.05$). No associations of cytokines aTNF- α , tVEGF-A, aVEGF-A in umbilical cord blood with psychomotor development in the infants at 6 months' CA were found.

3.5 Stage IV: FIRS and development in infants at 12 months' corrected age

The groups did not differ in terms of anthropometric measurements of the infants at 12 month's CA ($p>0.05$). The comparative age analysis of psychomotor development of functional fields in infants at 12 months' CA is provided in Table 12.

Table 12. The comparative analysis of development in infants at 12 months' CA

Functional field/age	Total n=144	FIRS group n= 42	Control group n=102	p value
Crawling age, months Average \pm SD Median [min - max]	11.51 \pm 11.14 12 [7-12]	10.93 \pm 1.63 12 [7-12]	11.75 \pm 0.75 12 [8-12]	<0.001
Sitting age, months Average \pm SD Median [min - max]	11.62 \pm 0.97 12 [6-12]	11.14 \pm 1.46 12 [6-12]	11.82 \pm 0.57 12 [9-12]	<0.001
Toddling age, months Average \pm SD Median [min - max]	11.59 \pm 1.01 12 [6-12]	10.98 \pm 1.57 12 [6-12]	11.84 \pm 0.48 12 [9-12]	<0.001
Grasping age, months Average \pm SD Median [min - max]	11.75 \pm 0.84 12 [7-12]	11.45 \pm 1.31 12 [7-12]	11.87 \pm 0.50 12 [9-12]	0.039
Perception age, months Average \pm SD Median [min - max]	11.67 \pm 0.92 12 [6-12]	11.38 \pm 1.40 12 [6-12]	11.79 \pm 0.60 12 [8-12]	>0.05
Talking age, months Average \pm SD Median [min - max]	11.36 \pm 1.23 12 [6-12]	11.00 \pm 1.56 12 [6-12]	11.51 \pm 1.04 12 [6-12]	>0.05
Speech perception age, months Average \pm SN Median [min - max]	11.60 \pm 1.10 12 [6-12]	11.29 \pm 1.40 12 [6-12]	11.74 \pm 0.93 12 [6-12]	0.008
Social age, months Average \pm SN Median [min - max]	11.52 \pm 1.36 12 [7-12]	10.95 \pm 2.11 12 [7-12]	11.75 \pm 0.79 12 [7-12]	0.001

To summarize the data in Table 12, it can be stated that motor functions in the FIRS group infants at 12 months' CA also developed with some retardation comparing with the control group; furthermore, in the former group impairment on the infants' social development was observed. The correlation between the amounts of aVEGF in umbilical cord blood and the head size in the infant at 12 months' CA, as well as the amounts cytokines IL-6, tTNF- α , aVEGF in umbilical cord blood and psychomotor development in the infants was determined. The critical values of aVEGF were not significant for the development prognosis for the infants' at 12 months' CA ($p>0.05$). The relative risk of 2 or more months' retardation in the development of the infants at 12 months' CA when umbilical cord blood IL-6 ≥ 11 pg/ml and with the critical values of cytokines IL-6 tTNF- α , in umbilical cord blood determined in the study (Table 13).

Table 13. FIRS and development disorder predicting in infants at 12 months' CA

FIRS (cord blood IL-6≥ 11 pg/ml)		RR of development disorder in the infant at 12 months' CA [95 % CI]
At least one psychomotor impairment ≥ 2 months	No	1
	Yes	2.7 [1.6-4.7]**
Motor impairment ≥ 2 months	No	1
	Yes	3.8 [2.0-7.2]**
Psychosocial retardation ≥ 2 months	No	1
	Yes	2.8 [1.5-5.0]*
* $p<0.01$; ** $p<0.001$		
Development disorder and critical value of cytokine in cord blood		RR of development disorder in the infant at 12 months' CA [95 % CI]
At least one psychomotor impairment ≥ 2 months, when IL-6 >13 pg/ml when tTNF- $\alpha >66$ pg/ml	No	1
	Yes	3.0 [1.8-5.1] *** 2.6 [1.4-2.8]**
Motor impairment ≥ 2 months when IL-6 >6.2 pg/ml	No	1
	Yes	3.9 [2.0-7.8] ***
Psychosocial retardation ≥ 2 months, when IL-6 >13 pg/ml when tTNF- $\alpha >66$ pg/ml	No	1
	Yes	2.9 [1.6-5.4] *** 2.3 [1.1-4.6] *

RR – Relative Risk; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

Table 13 shows that studies of the amounts of cytokines IL-6 and tTNF- α are significant to predict psychomotor development in infants at 12 months' of CA. The amounts of cytokines aTNF- α , tVEGF in in umbilical cord blood and psychomotor development in infants at 12 months' of CA were not found to be correlated.

4. CONCLUSIONS

1. Independent risk factors of the pregnant woman for FIRS include: the gestation of 30 weeks and less; the body temperature before labour and delivery 37°C and more; histologically confirmed chorioamnionitis (with/without funisitis)/deciduitis; postpartum endometritis.
2. The relative risk of the severe respiratory distress syndrome, serious injury of the central nervous system, mild/severe stage of retinopathy in preterm newborns, death and psychomotor retardation at 12 months' corrected age in newborns with suspected FIRS ($\text{IL-6} \geq 11 \text{ pg/ml}$ in umbilical cord blood) increases in the early infancy.
3. The correlation among the amounts of cytokines IL-6 and $\text{tTNF-}\alpha$ in umbilical cord blood and the severe respiratory distress syndrome, serious injuries of the central nervous system, mild/severe stage of retinopathy in preterm newborns, death and psychomotor retardation at 6 and 12 months' corrected age was determined. The amounts of $\text{aVEGF } \alpha$ in umbilical cord blood and the head size of infants at 6 and 12 months' corrected age, and psychosocial development of infants at 12 months' corrected age were also found to be correlated.
4. In the study, the critical values of cytokines in umbilical cord blood significant for making predictions regarding the health of the preterm newborn and his/her psychomotor development before 12 months' corrected age were established.

5. PUBLICATIONS AND SCIENTIFIC CONFERENCE REPORTS

Publications

1. Pilypienė I, Drazdienė N, Dumalakienė I, Vezbergienė N, Bartkevičienė D, Šilkūnas M. Priešlaikinis gimdymas ir vaisiaus uždegiminio atsako sindromas. *Medicinos teorija ir praktika* 2008;14(1):8-17.
2. Pilypienė I, Drazdienė N, Dumalakienė I, Vezbergienė N, Bartkevičienė D, Šilkūnas M. Vaisiaus uždegiminio atsako sindromo įtaka neišnešiotu naujagimio psichomotorinei raidai atskirais kūdikystės laikotarpiais. *Sveikatos mokslai* 2011;21(1):3860-68.
3. Pilypienė I, Drazdienė N, Dumalakienė I, Bartkevičienė D, Šilkūnas M, Motiejūnienė V. Vaisiaus uždegiminis atsakas ir pokyčiai placentoje. *Sveikatos mokslai* 2011;21(6):121-30.
4. Pilypienė I, Drazdienė N, Dumalakienė I, Vezbergienė N, Bartkevičienė D, Drejerienė V. Uždegimo žymenų vertė, prognozuojant neišnešiotu naujagimio psichomotorinę raidą 1 metų koreguotame amžiuje. *Medicinos teorija ir praktika* 2011;17(4):437-44.

Conference reports

1. Pilypienė I, Drazdienė N, Dumalakienė I, Vezbergienė N. Vaisiaus uždegiminio atsako sindromas. Neonatologijos asociacijos konferencija „Naujagimių infekcija“; 2007 Vilnius (oral report).
2. Pilypienė I, Drazdienė N, Dumalakienė I, Vezbergienė N, Bartkevičienė D, Šilkūnas M. Uždegimo žymenų reikšmė ankstyvajai neišnešiotu naujagimio adaptacijai. 9-asis Lietuvos akušerių ginekologų suvažiavimas; 2010 Kaunas (poster report).
3. Pilypienė I, Drazdienė N, Dumalakienė I, Vezbergienė N, Bartkevičienė D, Šilkūnas M. Fetal Inflammatory Response Syndrome and Rethinopathy of Prematurity. 1st Baltic Paediatric Congress; 2011 Vilnius (poster report).
4. Pilypienė I, Drazdienė N, Dumalakienė I, Vezbergienė N, Bartkevičienė D, Šilkūnas M. Fetal Inflammation and Later Adaptation of Premature Infant. 1st Baltic Paediatric Congress; 2011 Vilnius (poster report).

6. SUMMARY IN LITHUANIAN

Dėl pagerėjusios perinatalinės priežiūros per pastaruosius metus neišnešiotų naujagimių išgyvenamumas labai pagerėjo. Tačiau, kai neišnešiotų naujagimių išgyvena vis daugiau, daugėja ir vaikų, kuriems augant, išryškėja ilgalaikiai sveikatos sutrikimai, pabloginantys jų pačių ir visos šeimos gyvenimo kokybę.

Nurodoma, kad dažniausia neišnešiotu naujagimio gimimo priežastis yra intrauterinė infekcija, kuri moteriai neretai yra lėtinė ir besimptomė, todėl pirmalaikį gimdymą gana sunku prognozuoti. Progresuodama intrauterinė infekcija gali inicijuoti vaisiaus uždegiminį atsaką - vaisiaus uždegiminio atsako sindromą (VUAS), kurio metu vaisiuje suintensyvėja citokinų IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , defensinų, augimo veiksnių gamyba. VUAS pasekmė - sunkūs vaisiaus ir naujagimio pažeidimai bei vėlesni liekamieji kūdikio sveikatos sutrikimai, tokie kaip cerebrinis paralyžius ir lėtinė plaučių liga. VUAS apibrėžiamas IL-6 koncentracijos padidėjimu vaisiaus kraujo plazmoje ≥ 11 pg/ml. Literatūroje nurodoma didesnė imunologinių tyrimų vertė, nes, esant bakterijų invazijai, citokinų koncentracijų padidėjimas nustatomas 6-10 kartų dažniau nei aptinkamos pačios bakterijos.

Yra paskelbta nemažai tyrimų, kurie nurodo VUAS ir neišnešiotu naujagimio CNS pažeidimo, lėtinės plaučių ligos ryšį. Tyrimų, kurie rodytų perinatalinio uždegimo ir neišnešiotu naujagimio psichomotorinės raidos sąsajas nėra daug. Ryšys tarp VUAS ir neišnešiotų naujagimių retinopatijos atrastas pakankamai neseniai, tad tyrimų šia kryptimi atlikta taip pat nedaug. Bandymų nustatyti virkštelės kraujo VEGF koncentracijų ir neišnešiotų naujagimių retinopatijos tarpusavio ryšį iki šiol nebuvo. Publikacijų apie vaisiaus uždegimo žymenų TNF- α ir VEGF ir neišnešiotu naujagimio psichomotorinės raidos sąsajas paskelbta taip pat negausiai, todėl šių tyrimų taikymas kasdieninėje praktikoje kol kas nėra rutininis ir reikalauja tolimesnių tyrinėjimų, kaupiant duomenis duomenų bazėse.

Ryšys tarp perinatalinio uždegimo ir grėsmingų naujagimystės komplikacijų leidžia daryti prielaidą, kad neišnešiotu naujagimio ankstyvas sveikatos vertinimas ir gyvenimo kokybės prognozė yra labai svarbūs, norint kuo anksčiau pradėti tikslinį gydymą bei ankstyvą vaiko raidos korekciją. Tam pagelbėtų virkštelės kraujo citokinų tyrimai, kurie Lietuvoje naujagimio sveikatos prognozės tikslu dar nebuvo atliekami. Šis darbas – tai pirmasis klinikinis bandymas, siekiantis

įvertinti virkštelės kraujo uždegiminių citokinių pokyčių reikšmę neišnešoto naujagimio būklei po gimimo ir psichomotorinei raidai.

Tirtasis kontingentas ir tyrimo metodika. Tyrimo objektą sudaro virkštelės kraujo citokinių IL-6, bTNF- α , bVEGF-A, aTNF- α , aVEGF-A ir 22-34 nėštumo savaitę gimusių naujagimių sveikatos iki 1 metų koreguoto amžiaus (KA) tyrimai. Perspektyvusis atvejo – kontrolės tyrimas vykdytas Vilniaus miesto klinikinėje ligoninėje ir Vaikų ligoninės Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų filialo Neonatologijos centre 2007-2010 metais. Tiriamąjį kontingentą sudarė 22-34 nėštumo savaitių naujagimiai ir jų motinos. Naujagimių (vėliau kūdikių) ištyrimas vyko keturiais etapais: I etapas - pirmą gyvenimo savaitę; II etapas - išvyksatant iš stacionaro – 36-37 postkonceptinio amžiaus savaitę; III etapas - 6 mėnesių KA; IV etapas - 12 mėnesių KA. Įtraukimo į tyrimą kriterijai: 1) gimdyvės amžius >18 m; 2) nėštumas 22-34 sav. ir 6 dienos; 3) normaliai prisitvirtinusi placenta; 4) gimdyvė neserga cukralige, lėtinėmis širdies – kraujagyslių, kvėpavimo sistemos ligomis, sunkia mažakraujyste (Hb<80 g/l), autoimuninėmis ir onkologinėmis ligomis. Neįtraukimo į tyrimą kriterijai: 1) negyvagimis; 2) gimdyvės alkoholizmas, narkomanija; 3) naujagimio sklaidos trūkumai; 4) hemolizinė naujagimių liga; 5) virkštelės arterijos kraujo pH <7,00; 6) naujagimiui diagnozuota gimdymo trauma; 7) moters nesutikimas dalyvauti tyrime. Priklausomai nuo virkštelės kraujo citokino IL-6 koncentracijos, tiriamieji priskirti VUAS (IL-6 \geq 11 pg/ml) arba kontrolinei (IL-6<11 pg/ml) grupei, palyginti abiejų grupių naujagimių rodmenys po gimimo ir 6 bei 12 mėnesių KA. Imunologiniai virkštelės kraujo citokinių tyrimai atlikti Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Inovatyvios medicinos centre. Virkštelės venos kraujo IL-6, bTNF- α , bVEGF-A koncentracijos nustatytos ELISA, o aTNF- α ir aVEGF-A - BioLISA metodais. 6 ir 12 mėnesių KA kūdikių psichomotorinės raidos įvertinimas pagal Miuncheno funkcinės raidos diagnostikos metodiką atliko raidos vertinimo sertifikatą turintis gydytojas pediatras neonatologas. 6 mėnesių KA kūdikiams buvo vertinama ropojimo, sėdėjimo, vaikščiojimo, griebimo, suvokimo, kalbėjimo ir socialinės srities raida. 12 mėnesių KA kūdikiams buvo įvertintas ir kalbos supratimas. Pagal raidos funkcinių sričių tarpusavio ryšį, kūdikių raidos sutrikimas buvo priskirtas 1 iš 4 sutrikimų grupei: 1) judesių raidos sutrikimas; 2) smulkiųjų judesių raidos sutrikimas; 3) psichosocialinės raidos sutrikimas; 4) mišrus raidos sutrikimas.

Tyrimas buvo atliktas Lietuvos bioetikos komitete patvirtintu leidimu 2007-06-20 Nr.14. Imunologinius virkštelės kraujo tyrimus finansavo Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas (2008-04-07 Nr. T-101/08).

Statistinė duomenų analizė. Imties tūrio nustatymui buvo pasitelkta *Cochrane* duomenų bazės siūloma formulė:

$$n = \frac{z^2 v(1-v)}{\Delta^2}$$

Prieš pradėdant tyrimą, nustatyta, kad chorioamnionito kartu su funizitu – histologine VUAS išraiška - paplitimas neišnešiotų gimdymų tarpe Vilniaus miesto klinikinėje ligoninėje buvo apie 10 proc., todėl buvo apskaičiuota, kad imties tūris $n=138$ užtikrina populiaciją su ± 5 proc. paklaida, esant 95 proc. patikimumui. Įtraukti 158 naujagimiai.

Statistinė duomenų analizė atlikta standartinėmis statistinėmis programomis SPSS 15.0 versija ir STATISTIKA 6.0 versija, vertinant testus: Kolmogorovo-Smirnovo, Stjudento, Mano ir Vitnio, χ^2 kriterijų, skaičiuojant koreliacijos koeficientus, panaudojant logistinės regresijos, Kokso regresinės analizės metodus. Tyrimų jautrumas ir specifiškumas buvo skaičiuojamas analizuojant ROC kreives. Tikrinant statistines hipotezes, pasirinktas reikšmingumo lygmuo 0,05.

Rezultatai

Naujagimių motinų demografiniai, socialiniai ir akušeriniai veiksniai. Atsižvelgiant į tiriamąsias grupes, socialiniai ir demografiniai naujagimių motinų veiksniai, išskyrus išsilavinimą, statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Naujagimių motinų sveikatos neštumo metu skirtumai tarp lyginamųjų grupių taip pat nenustatyti ($p>0,05$). VUAS grupės naujagimių motinų neštumas buvo trumpesnis, bevandenis laikotarpis ilgesnis, jos dažniau gimdė natūraliu būdu ir joms dažniau buvo diagnozuotas endometritas po gimdymo.

Histologinio tyrimo metu uždegiminiai pokyčiai nustatyti 40,3 proc. placentų. Histologinio chorioamnionito be funizito ir deciduito dažnis abiejose grupėse nesiskyrė ($p>0,05$). 51 proc. VUAS grupės placentų nustatytas histologinis chorioamnionitas kartu su funizitu, o kontrolinėje

grupėje šie pokyčiai rasti 1 proc. placentų ($p < 0,001$). 10 proc. VUAS grupės placentų jokių pataloginių pokyčių nenustatyta.

Daugiaveiksnės logistinės regresijos metu nustatyti nėščiosios rizikos veiksniai, kurie prognozuoja VUAS (v. kraujo IL-6 ≥ 11 pg/ml): nėštumo trukmė 30 sav. ir mažiau (GS 4,4 95 proc. PI 1,7-11,4), temperatūra prieš gimdymą 37° C ir daugiau (GS 6,7 95 proc. PI 1,4-31,2), histologinis chorioamnionitas (su funizitu ar be jo) ar deciduitas (GS 8,4 95 proc. PI 3,4-20,7), endometritas po gimdymo (GS 4,9 95 proc. PI 1,4-16,8).

I etapas: VUAS ir naujagimių sveikata ankstyvuoju adaptacijos laikotarpiu. Naujagimiai pagal lytį pasiskirstė vienodai, skirtumas tarp grupių nenustatytas ($p > 0,05$). Tiriamųjų gestacijos amžiaus vidurkis buvo 31,3 \pm 2,9 savaitės ir jis reikšmingai ($p < 0,001$) trumpesnis buvo VUAS grupėje - 29,5 \pm 3,1 sav., lyginant su kontroline grupe - 32,2 \pm 2,4 savaitės. VUAS grupėje hipertrofiškų naujagimių gimė daugiau ($p < 0,05$). Naujagimių virkštelės arterijos kraujo pH vidurkis buvo 7,3 \pm 0,1, skirtumas tarp grupių nenustatytas ($p > 0,05$), tačiau virkštelės arterijos kraujo pH $\leq 7,20$ VUAS grupėje buvo nustatyta dažniau ($p = 0,026$).

Ūminis naujagimių kvėpavimo sutrikimų sindromas (KSS) buvo diagnozuotas 78 proc. naujagimių, 50 proc. atvejų vidutinio ir sunkaus laipsnio. Sunkaus laipsnio KSS dažnesnis buvo VUAS grupės naujagimiams ($p = 0,002$). Nustatytas ūminio naujagimių KSS ir virkštelės kraujo IL-6 bei bTNF- α koncentracijų tarpusavio ryšys. Įvertinę naujagimių gestacijos amžių, regresinės analizės metu nustatėme sunkaus naujagimių KSS reliatyvią riziką, jei virkštelės kraujo IL-6 koncentracija ≥ 11 pg/ml, ir esant mūsų tyrimo metu nustatytoms virkštelės kraujo IL-6 ir bTNF- α kritinėms vertėms (1 lentelė).

1 lentelė. Regresinės analizės modelis, prognozuojant naujagimiui sunkaus laipsnio KSS

VUAS (virkštelės kraujo IL-6 ≥ 11 pg/ml)		Sunkaus laipsnio KSS RR [95 proc. PI]
Ne		1
Taip		4,0 [1,9-8,5]
$p < 0,001$		
Virkštelės kraujo citokino kritinė vertė		Sunkaus laipsnio KSS RR [95 proc. PI]
IL-6 > 15 pg/ml	Ne	1
	Taip	5,2 [2,5-10,8]*
bTNF- α $> 105,4$ pg/ml	Ne	1
	Taip	8,4 [4,0-17,7]*

KSS – kvėpavimo sutrikimų sindromas; RR – realiatyvi rizika ; * $p < 0,001$

Neurosonoskopijos metu nustatyta, kad 66,9 proc. naujagimių pataloginių pokyčių galvos smegenyse nebuvo, 18,5 proc. naujagimių diagnozuotos I° intraskilvelinės kraujosruvos (ISK), 9,6 proc. - II° ISK ir 5,1 proc. - \geq III° ISK ($\chi^2=28,8$; l.l.=3; $p<0,001$). VUAS grupėje buvo daugiau naujagimių, kuriems nustatytos II° ir \geq III° ISK ($p<0,01$). Naujagimių neurosonoskopiniai pokyčiai reikšmingai siejosi su virkštelės kraujo IL-6 ir bTNF- α koncentracijomis. Nustatytos virkštelės kraujo citokinų IL-6 ir bTNF- α kritinės vertės, prognozuojant \geq III° ISK (2 lentelė). Įvertinus naujagimių gestacijos amžiaus įtaką, nustatyta reliatyvioji rizika, prognozuojant \geq III° ISK (2 lentelė).

2 lentelė. Regresinės analizės modelis, prognozuojant naujagimiui \geq III° ISK ankstyvuuju adaptacijos laikotarpiu

VUAS (virkštelės kraujo IL-6 \geq 11 pg/ml)		\geq III° ISK RR [95 proc. PI]
Ne		1
Taip		8,0 [1,6-40,2]
$p<0,05$		
Virkštelės kraujo citokino kritinė vertė		\geq III° ISK RR [95 proc. PI]
IL-6 >13 pg/ml	Ne	1
	Taip	10,0 [2,0-50,1]*
bTNF- α >116,4 pg/ml	Ne	1
	Taip	44,2 [5,4-362,9]**

ISK – intraskilvelinės kraujosruvos; RR – reliatyvioji rizika; * $p<0,01$; ** $p<0,001$

Virkštelės kraujo citokinų aTNF- α , aVEGF, bVEGF koncentracijų ir ūminio naujagimių KSS bei neurosonoskopinių pokyčių tarpusavio ryšys nenustatytas.

Daugiaveiksnės logistinės regresijos metu nustatyti naujagimių kraujo rodmenų rizikos veiksniai, prognozuojantys VUAS, buvo: hemoglobino koncentracija kraujyje 182 g/l ir mažiau (GS 2,8 95 proc. PI 1,2-6,2), eritroblatų kiekis kraujyje 3/100 ir daugiau (GS 2,2 95 proc. PI 1,0-4,8), CRB koncentracija kraujyje 4,5 mg/l ir daugiau (GS 5,5 95 proc. PI 2,3-13,0).

II etapas: VUAS ir naujagimių sveikata vėlyvuuju adaptacijos laikotarpiu. 59,9 proc. tiriamųjų pataloginių pokyčių galvos smegenyse nebuvo nustatyta, 32,9 proc. naujagimių diagnozuoti nedideli (I° ISK, nežymus smegenų skilvelių išsiplėtimas ir pan.), o 7,2 proc. – dideli galvos smegenų pokyčiai (PVL, hidrocefalija, ventrikulomegalija; $\chi^2=21,7$; l.l.=3; $p<0,001$). Neurosonoskopiniai pokyčiai buvo dažniau nustatyti VUAS grupės naujagimiams. Periventrikulinė

leukomaliacija (PVL) buvo diagnozuota 2 naujagimiams - 1,3 proc. visų tiriamųjų. Abu naujagimiai buvo VUAS grupės. Nustatytas virkštelės kraujo IL-6 koncentracijų ir CNS pataloginių pokyčių tarpusavio ryšys. Šiame amžiaus laikotarpyje virkštelės kraujo bTNF- α koncentracijos turėjo tendenciją sietis su neurosonoskopiniais pokyčiais ($p=0,067$). Įvertinus naujagimių gestacijos amžių, nustatyta didelių neurosonoskopinių pokyčių reliatyvioji rizika, jei virkštelės kraujo IL-6 ≥ 11 pg/ml, ir esant tyrimo metu nustatytai virkštelės kraujo IL-6 kritinei vertei (3 lentelė). Virkštelės kraujo IL-6 kritinė vertė, prognozuojant PVL, buvo nereikšminga ($p>0,05$).

3 lentelė. Regresinės analizės modelis, prognozuojant naujagimiui didelius neurosonoskopinius pokyčius vėlyvuoju adaptacijos laikotarpiu

VUAS (virkštelės kraujo IL-6 ≥ 11 pg/ml)	Didelių neurosonoskopinių pokyčių RR [95 proc. PI]
Ne	1
Taip	8,3 [2,2-31,7]

$p<0,01$

Virkštelės kraujo citokino kritinė vertė	Didelių neurosonoskopinių pokyčių RR [95 proc. PI]
IL-6 >13 pg/ml	1
Ne	9,9 [2,6-37,9]
Taip	

Dideli neurosonoskopiniai pokyčiai: PVL, hidrocefalija, ventrikulomegalija; RR – reliatyvi rizika; $p=0,001$

Neišnešiotų naujagimių retinopatija (NNR) buvo diagnozuota 24,8 proc. išgyvenusių naujagimių ($n=149$). Nustatyta, kad 57 proc. naujagimių NNR buvo vidutinio ar sunkaus laipsnio (II-III st. ar III-IV st.). VUAS grupėje NNR buvo diagnozuota dažniau ($p=0,031$). Nustatytas NNR ir virkštelės kraujo IL-6 ir bTNF- α koncentracijų tarpusavio ryšys. Nustatyta, kad virkštelės kraujo citokinas bTNF- α prognozuoja ir NNR progresavimą. Citokinių IL-6 ir bTNF- α kritinės vertės ir II-III / III-IV st. NNR prognozė pateikiama 4 lentelėje.

4 lentelė. Regresinės analizės modelis, prognozuojant naujagimiui II-III st. / III-IV st. NNR

VUAS (virkštelės kraujo IL-6 \geq 11 pg/ml)	II-III st. / III-IV st. NNR RR [95 proc. PI]
Ne	1
Taip	2,5 [1,1-6,0]

p<0,05

Virkskelės kraujo citokino koncentracija	II-III st. / III-IV st. NNR RR [95 proc. PI]	NNR progresavimo iki III-IV st. RR [95 proc. PI]
IL-6 >13 pg/ml	Ne Taip	1 3,0 [1,3-7,1]*
bTNF- α >114,6 pg/ml	Ne Taip	1 7,0 [2,9-16,6]**
*p<0,05; **p<0,001		

NNR – neišnešiotų naujagimių retinopatija; RR – reliatyvi rizika;

Virkskelės kraujo aVEGF koncentracijos turėjo tendenciją sietis su NNR (p=0,064).

Nekrozinis enterokolitas ir atviras arterinis latakas buvo dažniau diagnozuoti VUAS grupės naujagimiams, tačiau skirtumas tarp grupių nebuvo pakankamai reikšmingas (p=0,062 ir p=0,139). Bronchų ir plaučių displazija nebuvo diagnozuota nė vienam naujagimiui.

Tyrimo metu mirė 9 naujagimiai - 5,7 proc. visų tiriamųjų. Visi mirę naujagimiai buvo VUAS grupės. Šioje grupėje naujagimių mirtingumas buvo 17,3 proc. Skirtumas tarp grupių buvo reikšmingas (p<0,001), tačiau naujagimių mirties prognozė, kai virkskelės kraujo IL-6 \geq 11 pg/ml, buvo nereikšminga (p>0,05). Nustatyta, kad naujagimių mirtis koreliavo tiek su virkskelės kraujo IL-6, tiek su bTNF- α koncentracijomis. Regresinės analizės būdu nustatyta naujagimių mirties reliatyvioji rizika, esant tyrimo metu nustatytoms virkskelės kraujo citokinų kritinėms vertėms (5 lentelė).

5 lentelė. Regresinės analizės modelis, prognozuojant naujagimiui mirtį

Virkskelės kraujo citokino koncentracija	Naujagimio mirties RR [95 proc. PI]
IL-6 >12,7 pg/ml	Ne Taip
bTNF- α >365 pg/ml	Ne Taip

RR – reliatyvi rizika; *p<0,01; **p<0,001

Virkskelės kraujo citokinų - aTNF- α , aVEGF-A, bVEGF-A - ir neišnešiotų naujagimių retinopatijos, vėlyvojo adaptacijos laikotarpio neurosonoskopinių pokyčių ir naujagimių mirties ryšys nenustatytas.

III etapas: VUAS ir 6 mėnesių koreguoto amžiaus kūdikių raida. Šiame amžiuje abiejų lyginamųjų grupių kūdikių antropometriniai rodmenys nesiskyrė ($p > 0,05$). VUAS grupės kūdikių ropojimo, sėdėjimo, griebimo, suvokimo ir socialinės raidos amžius buvo mažesnis ($p < 0,05$). Kūdikių vaikščiojimo ir kalbėjimo amžiaus skirtumo tarp grupių nebuvo ($p > 0,05$). Nustatytas virkštelės kraujo aVEGF koncentracijų ir 6 mėn. KA kūdikių galvos apimties bei virkštelės kraujo citokinų IL-6 ir bTNF- α koncentracijų ir kūdikių psichomotorinės raidos tarpusavio ryšys, tačiau šių citokinų kritinės vertės kūdikio raidos prognozei buvo nereikšmingos ($p > 0,05$). Virkštelės kraujo citokinų - aTNF- α , bVEGF-A, aVEGF-A - ir 6 mėn. KA kūdikių psichomotorinės raidos tarpusavio ryšys nenustatytas.

IV etapas: VUAS ir 12 mėnesių koreguoto amžiaus kūdikių raida. Kūdikių antropometrinių rodmenų skirtumo tarp grupių nebuvo ($p > 0,05$). VUAS grupės kūdikių ropojimo, sėdėjimo, vaikščiojimo, griebimo, kalbos supratimo ir socialinės raidos amžius buvo mažesnis ($p < 0,05$). Kūdikių suvokimo ir kalbėjimo amžiaus skirtumas tarp grupių nenustatytas ($p > 0,05$). Nustatytas virkštelės kraujo aVEGF koncentracijų ir 12 mėn. KA kūdikių galvos apimties bei virkštelės kraujo IL-6, bTNF- α , aVEGF koncentracijų ir kūdikių psichomotorinės raidos tarpusavio ryšys. Virkštelės kraujo aVEGF kritinės vertės, prognozuojant kūdikių raidą buvo nereikšmingos ($p > 0,05$). Nustatyta 12 mėn. KA kūdikių 2 ir daugiau mėnesių raidos atsilikimo reliatyvioji rizika, kai virkštelės kraujo IL-6 ≥ 11 pg/ml, ir esant mūsų tyrimo metu nustatytoms virkštelės kraujo citokinų IL-6 ir bTNF- α , kritinėms vertėms (6 lentelė).

6 lentelė. VUAS ir 12 mėn. KA kūdikių raidos sutrikimų prognozė

VUAS (virkštelės kraujo IL-6\geq11 pg/ml)		12 mėn. KA kūdikių raidos sutrikimo RR [95 proc. PI]
Bent vienas psichomotorinio vystymosi atsilikimas \geq 2 mėn.	Ne Taip	1 2,7 [1,6-4,7]**
Judesių raidos atsilikimas \geq 2 mėn.	Ne Taip	1 3,8 [2,0-7,2]**
Psichosocialinės raidos atsilikimas \geq 2 mėn.	Ne Taip	1 2,8 [1,5-5,0]*
*p<0,01; **p<0,001		
Raidos sutrikimas ir virkštelės kraujo citokino kritinė vertė		12 mėn. KA kūdikių raidos sutrikimo RR [95 proc. PI]
Bent vienas psichomotorinio vystymosi atsilikimas \geq 2 mėn. kai IL-6>13 pg/ml kai bTNF- α >66 pg/ml	Ne Taip	1 3,0 [1,8-5,1] *** 2,6 [1,4-2,8]**
Judesių raidos atsilikimas \geq 2 mėn., kai IL-6 >6,2 pg/ml	Ne Taip	1 3,9 [2,0-7,8] ***
Psichosocialinės raidos atsilikimas \geq 2 mėn., kai IL-6>13 pg/ml kai bTNF- α >66 pg/ml	Ne Taip	1 2,9 [1,6-5,4] *** 2,3 [1,1-4,6] *

RR –reliatyvi rizika; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Virkštelės kraujo citokinų aTNF- α , bVEGF koncentracijų ir 12 mėn. KA kūdikių psichomotorinės raidos tarpusavio ryšys nenustatytas.

Tyrimo išvados

1. Nepriklausomi nėščiosios rizikos veiksniai vaisiaus uždegiminio atsako sindromui išsivystyti yra: nėštumo trukmė 30 savaičių ir mažesnė; kūno temperatūra prieš gimdymą 37 °C ir daugiau; histologiškai patvirtintas chorioamnionitas (su funizitu ar be jo) ar deciduitas; endometritas po gimdymo.
2. Naujagimiams, kuriems įtartas vaisiaus uždegiminio atsako sindromas (virkštelės kraujo IL-6 ≥ 11 pg/ml), naujagimystės laikotarpiu didėja sunkaus kvėpavimo sutrikimų sindromo, sunkaus centrinės nervų sistemos pažeidimo, vidutinės ir sunkios neišnešiotų naujagimių retinopatijos, mirties ir psichomotorinio vystymosi atsilikimo 12 mėn. koreguotame amžiuje reliatyvioji rizika.
3. Nustatytas virkštelės kraujo citokinų IL-6 ir bTNF- α koncentracijų bei sunkaus naujagimių kvėpavimo sutrikimų sindromo, sunkaus centrinės nervų sistemos pažeidimo, vidutinės ir sunkios neišnešiotų naujagimių retinopatijos, naujagimių mirties bei 6 ir 12 mėn. koreguoto amžiaus kūdikių psichomotorinės raidos atsilikimo tarpusavio ryšys. Virkštelės kraujo aVEGF koncentracijas, 6 ir 12 mėn. koreguoto amžiaus kūdikių galvos apimtį, 12 mėn. koreguoto amžiaus kūdikių psichosocialinę raidą taip pat siejo tarpusavio ryšys.
4. Tyrime nustatytos virkštelės kraujo citokinų kritinės vertės, reikšmingos numatant neišnešiotą naujagimio sveikatos ir psichomotorinės raidos iki 12 mėn. koreguoto amžiaus prognozę.

Praktinė tyrimo reikšmė

Pasiūlėme rizikos naujagimių atrankai tirti virkštelės kraujo citokinų IL-6 ir bTNF- α koncentracijas. Esant didesnėms virkštelės kraujo citokinų koncentracijoms už mūsų tyrimo metu nustatytas virkštelės kraujo citokinų kritines vertes, tikslinga būtų įvertinti naujagimio sveikatos ir psichomotorinės raidos sutrikimų riziką bei numatyti reikiamų specialistų dalyvavimą tolimesnėje vaiko raidoje.

7. BIOGRAPHY

Name: Ingrida Pilypienė
Address: Ažuolų st.38, Aukštuolės km, Vilniaus raj., Lithuania
E – mail: ingrida.pilypiene@gmail.com
Date of birth: 6 April 1971
Birth place: Vilnius, Lithuania

Medical education:

1989–1995 Vilnius University Faculty of Medicine
1995–1996 Residency in Pediatric, Department of Pediatrics,
Vilnius University Faculty of Medicine
1997–1998 Residency in Neonatology, Department of Neonatology,
Vilnius University Faculty of Medicine

Job experience:

1998 - Neonatologist at the Department of Neonatology
Vilnius City Clinical Hospital
2004 - Neonatologist at the Department of Obstetrics - Neonatology
Centro Affiliate of Vilnius University Hospital Santariškių Klinikos
2011 - Assistant at the Vilnius University Faculty of Medicine, Clinic of
Children's diseases

Pedagogical work:

Seminars with residents of Vilnius University Faculty of Medicine